

Na⁺-K⁺-Cl⁻ cotransport system in brain capillary endothelial cells : response to endothelin and hypoxia

著者	河合 伸念
内容記述	<p>Thesis (Ph. D. in Medical sciences)--University of Tsukuba, (B), no. 1334, 1997.11.30</p> <p>On t.p. "[+]" "[-]" is superscript</p> <p>Joint authors: Richard M. McCarron and Maria Spatz</p> <p>Offprint. Originally published in: Neurochemical research, v. 21, no. 10, pp. 1259-1266, 1996.</p> <p>Includes supplementary treatises</p>
発行年	1997
その他のタイトル	脳内毛細血管内皮細胞に於けるナトリウム-カリウム-クロライド共輸送機構に関する研究 : エンドセリン及び低酸素状態に対する反応について
URL	http://hdl.handle.net/2241/1625

氏 名(本 籍)	かわい のぶ とし 河 合 伸 念 (愛 知 県)
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 乙 第 1,334 号
学位授与年月日	平 成 9 年 11 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
審 査 研 究 科	医 学 研 究 科
学 位 論 文 題 目	Na ⁺ -K ⁺ -Cl ⁻ Cotransport System in Brain Capillary Endothelial Cells : Response to Endothelin and Hypoxia (脳内毛細血管内皮細胞に於けるナトリウム-カリウム-クロライド共輸送機構に関する研究：エンドセリン及び低酸素状態に対する反応について)
主 査	筑波大学教授 薬学博士 後 藤 勝 年
副 査	筑波大学教授 医学博士 能 勢 忠 男
副 査	筑波大学教授 理学博士 坂 内 四 郎
副 査	筑波大学教授 医学博士 岡 戸 信 男
副 査	筑波大学助教授 医学博士 玉 岡 晃

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

脳・血液関門の重要な機能の 1 つに様々な物質の脳・血液間輸送が挙げられるが、Na⁺、K⁺、Cl⁻などのイオンも、脳内毛細血管内皮細胞上に存在する Na⁺、K⁺-ATPase、Na⁺-K⁺-Cl⁻cotransport 等のイオントランスポーターによって脳・血液間の移動が制御されている。これらイオントランスポーターの異常が、脳虚血時などの脳浮腫発生機序に関与しているとの報告もあり、その調節機構の解明が新たな脳浮腫予防や治療法につながる可能性を秘めている。そしてこれまでに、培養した脳内毛細血管内皮細胞を用いた一連の実験から、endothelin-1 や低酸素状態が Na⁺-K⁺-Cl⁻cotransport を刺激することが明らかとなった。Na⁺-K⁺-Cl⁻cotransport は、消化管の腺組織や腎尿細管などでイオンと水分の分泌・吸収を司ることが知られており、脳・血液関門でも同様の機能を持つ可能性が高い。そこで本研究では、endothelin-1 や低酸素状態がラット大脳より分離・培養した毛細血管内皮細胞上の Na⁺-K⁺-Cl⁻cotransport に及ぼす影響を比較検討し、それらの反応に関与する protein kinase C (PKC) や細胞内 Ca²⁺ 等、signal transduction の機構を解明することを目的とした。

(対照と方法)

1. 細胞：Spatz ら (Brain Research, 1980) の方法に従い、8-12 週齢 Wistar-Kyoto 系ラット大脳皮質から毛細血管内皮細胞 (以下 RBEC と略記) を分離・培養した。

2. Na⁺-K⁺-Cl⁻cotransport 活性の測定：⁸⁶Rb⁺ を K⁺ の指標として用いた。96 穴式 microtiter plate 上に培養した RBEC に、endothelin-1 その他種々の薬物存在下に 0.2 μCi の ⁸⁶Rb⁺ を加え、10 分間インキュベートした後直ちに洗浄し、細胞内に取り込まれた放射活性を液体シンチレーションカウンターによって測定した。Na⁺-K⁺-ATPase 阻害薬である ouabain (2 mM) と、Na⁺-K⁺-Cl⁻cotransport 阻害薬である bumetanide (20 μM) を用い、これらにより制御される K⁺ 取り込み活性をそれぞれ Na⁺-K⁺-ATPase 及び Na⁺-K⁺-Cl⁻cotransport 活性と定義した。

3. ミトコンドリア阻害薬による低酸素状態 RBEC モデルの作成：ミトコンドリアの呼吸鎖阻害薬である oli-

gomycin (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sodium azide (5 mM), 及び antimycin A (0.1 μM) それぞれの存在下に RBEC を30分間 インキュベートし, 細胞内 ATP を減少させ低酸素状態モデルとした。比較のため, 解糖系の酵素阻害薬である ヨード酢酸 (1 mM) 処理群と, グルコース代謝の阻害薬である 2-deoxyglucose を oligomycin と同時に用いた群で同様の実験を行った。

4. K^+ 放出活性の測定: RBEC を $^{86}\text{Rb}^+$ (0.1 μCi) 存在下に 37°C, 2 時間 インキュベートした後洗浄し, 引き続き endothelin 等の薬物を溶解した 150 ml の buffer を加えて インキュベーションを開始した。一定時間後に buffer 内に放出された $^{86}\text{Rb}^+$ と細胞内に残存する $^{86}\text{Rb}^+$ の放射活性をそれぞれ液体シンチレーションカウンターで測定した。細胞外に放出された $^{86}\text{Rb}^+$ の全 $^{86}\text{Rb}^+$ に対する割合を計算し, K^+ の放出活性とした。

(結果)

1. endothelin-1 による RBEC の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport 刺激作用: endothelin-1 (10 nM) によって RBEC の K^+ 総取り込み量は約 3 倍に増加し, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport がその優位な (60-70%) 経路であった。細胞内 Ca^{2+} 増加作用を持つ thapsigargin と, PKC 刺激薬の phorbol myristate acetate (PMA) は, ともに $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport 活性を増加させたが, 個々の作用は endothelin-1 単独の作用よりも有意に小さかった。両薬物を同時に投与したところ相加的に作用し, ほぼ endothelin-1 等しい活性レベルが得られた。PKC 阻害薬である bisindolylmaleimide は, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport の基礎的活性と thapsigargin による刺激には変化を与えず, PMA による刺激を完全に抑制し, endothelin-1 刺激も有意に (そして部分的に) 阻害した。一方, BAPTA/AM を用いて細胞内 Ca^{2+} をキレートした細胞群では, 基礎的活性, thapsigargin 刺激, PMA 刺激, endothelin-1 刺激の何れも有意に阻害された。

2. 低酸素状態モデル RBEC における $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport 活性の増加: oligomycin, sodiumazide, 及び antimycin A で処理した低酸素状態モデル RBEC では, 細胞内 ATP 量が何れもコントロール群の約 60% から 30% にまで減少し, ヨード酢酸処理群や, oligomycin + 2-deoxyglucose 群では約 10% とさらに低下した。細胞内 ATP 量の減少した細胞では何れも有意な $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性の減少が認められたが, 一方 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport 活性は低酸素状態モデル群でコントロール群よりも高い活性を示し, ヨード酢酸処理群及び oligomycin + 2-deoxyglucose 群では有意に低かった。oligomycin による $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport 刺激効果は BAPTA/AM によって強く阻害されたが bisindolylmaleimide によっては全く阻害されなかった。

3. endothelin-1 及び低酸素状態による RBEC の K^+ 放出刺激作用: oligomycin で処理した低酸素状態 RBEC や endothelin-1 投与群ではコントロール群に比べて K^+ 放出活性が増加し, Ca^{2+} ionophore (A 23187) 投与群でも endothelin-1 投与群と同程度に K^+ 放出が刺激された。 Ca^{2+} -activated K^+ channel の阻害薬である quinine 存在下では, endothelin-1, Ca^{2+} ionophore, oligomycin による K^+ 放出刺激は何れもほぼ完全に抑制された。

(考察)

thapsigargin と PMA がそれぞれ RBEC の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport 活性を刺激し, また両薬物の同時投与によりほぼ ET-1 刺激と等しい活性レベルが得られたことや, PKC 阻害薬である bisindolylmaleimide が thapsigargin 刺激には変化を与えず, PMA 刺激を完全に抑制し, endothelin-1 刺激も有意かつ部分的に阻害すること, さらに細胞内 Ca^{2+} キレート群では, 基礎的活性, thapsigargin 刺激, PMA 刺激, endothelin-1 刺激の何れも有意に阻害されたことから, この細胞の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport 活性の制御には protein kinase C によって媒介される情報伝達経路とこれを介さない別な経路とがあり, 何れの経路にも細胞内 Ca^{2+} が重要な役割を演じていることが示唆された。一方, 低酸素状態モデル RBEC の実験からは, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport の活性化には PKC は関与せず, 細胞内 Ca^{2+} の増加が関係していることが示唆された。また低酸素状態や endothelin-1 により RBEC の K^+ 放出活性は増加したが, この反応は Ca^{2+} ionophore (A 23187) 投与によっても ET-1 投与群と同程度に見られたことや, quinine 存在下ではほぼ完全に抑制されることから, quinine 感受性の Ca^{2+} -activated K^+ channel を介するものと考えられた。以上から, endothelin-1 や低酸素状態による RBEC の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport 刺激

には、PKC と細胞内 Ca^{2+} が深く関与しており、quinine 感受性 Ca^{2+} -activated K^+ channel を介した K^+ 放出の増加を伴っていることが示された。同様の RBEC の反応が脳虚血時等に脳・血液関門のレベルで起こる可能性があり、中枢神経系に於ける endothelin-1 の役割や脳浮腫のメカニズムを解明する上で興味ある所見と思われた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、Neurochemical Research 誌に full paper として発表されたもので、ラット大脳の毛細血管内皮細胞の $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport に対する endothelin-1 (ET-1) 及び低酸素状態の影響を調べると同時に、そのメカニズムを追求したものである。培養細胞を用いた *in vitro* の系に於て、比較的特異性の高い酵素阻害剤などを用いた薬理学的解析により、ET-1 や低酸素状態が、細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加を介して $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ cotransport 活性を増加させることを証明した研究で、結果の信頼性は高い。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。